



DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BENMENOUEUR NOUR EL HOUDA AMIRA

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et Transformation Laitières

Thème

**Caractérisation de la microflore lactique d'un
beurre Fermier De type Zebda beldia des zones
steppiennes de Naâma**

Soutenu publiquement le 02/07/2023

Devant les membres du jury

Président	Dr DAHOU Abdelkader El amine	Maître de conférences A	U. Mostaganem
Examineur	Dr ZABOURI Younes	Maître de conférences A	U. Mostaganem
Encadreur	Dr TAHLAITI Hafida	Maître de conférences A	U. Mostaganem
Co-encadrant	BEKIHAL Amine	Doctorant	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales
(LSTPA), Mostaganem

Année universitaire 2022-2023

REMERCIEMENTS

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, le Miséri cordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de finaliser ce travail dans de meilleurs conditions.

Nous tenons à remercier nous promotrice Madame TAHLAITI HAFIDA, pour nous avoir suivis durant notre travail dans le cadre de ce mémoire, pour ses aides, par ses conseils scientifique et ses orientations constructives tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Mes vifs remerciements à tous les membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail :

Nous tiens à remercier chaleureusement au président du jury Dr DAHOU.A et l'examineur Dr ZABOURI.Y d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'évaluer notre Modeste travail, nous sommes très reconnaissant.

A mon Co-encadreur Mr Bekihal.A, doctorant à l'université de Mostaganem, qui m'a supervisée tout au long de ce travail et qui m'a aidée par
Son savoir et son expérience.

Enfin, nous remercions, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail

DÉDICACE

J'ai l'immense plaisir de dédié ce travail à:

A mon père Benaissa et ma mère Moghrani zohra, Que ce travail soit
pour vous pour vos précieuses aide pendant toutes ces années

A ma grande mère Beddaiche Badra

Mon cher frère Assri, et mes adorables sœur :Feriel et Mekia et Nabila
pour leurs encouragements et leurs présences à mes côtés.

A mes chers amies: Roumaissa,Amina,Ouissam qui m'ont beaucoup
soutenue moralement dans les pires moments de désespoir.

Et pour mon cher ami Bouziane Mohamed EL Amine qui été toujours
à mes coté

Enfin je dédie ce travail à toute la promotion 2ème master Production
et transformation laitière 2023

Liste des abréviations

EST: Extrait sec total

G+C: Guanine+Cytosine

J.O.R.A.: Journal officiel de la République Algérienne

MG : Matière grasse

ssp: Sous espèce

Liste de tableaux

Tableau 01 : Composition moyenne pour 100g de beurre	05
Tableau 02 : Différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques	15
Tableau 03 : Milieux de culture et conditions d'incubation pour la recherche et le dénombrement de la flore lactique du beurre traditionnel.	37
Tableau 04 : Résultats de la MG de beurre fermier et brebis	37
Tableau 05 : Résultats du pH du beurre fermier (vache et brebis)	38
Tableau 06 : Résultats l'EST du beurre fermier	39
Tableau 07 : Dénombrement du beurre fermier de vache	47
Tableau 08 : Dénombrement du beurre fermier de vache et de brebis	49

Listedesfigures

- **Figure01:** Représentation schématique des étapes de la production du beurre. Le noir désigné, la phase continue aqueuse et le blanc indique, la phase continue lipidique 06
- **Figure02:** Microstructure du Zebda à température ambiante 06
- **Figure03:** Barattage traditionnel du beurre à l'aide d'une baratte classique 09
- **Figure04 :** Photo du beurre et de babeur 10
- **Figure05:** *Lactobacillus bulgaricus* au microscope électronique 14
- **Figure06:** Arbre phylogénétique décrivant la relation entre les familles d'ordre Lactobacillales basées sur la séquence du gène 16S de l'ARNr 17
- **Figure 07 :** Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible %G+C et les genres Gram positif liés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* 19
- **Figure08 :** Deux principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactique 22
- **Figure09 :** Situation géographique de laboratoire de recherche LSTPA de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem 25
- **Figure10 :** Echantillons de beurre fermier de vache et brebis 26
- **Figure11 :** Protocole expérimental général 27
- **Figure12 :** Mesure de la matière grasse par centrifugation 28
- **Figure13 :** Préparation de la solution mère avec le stomacher 29
- **Figure14 :** Préparation des dilutions de beurre du 10^{-1} à 10^{-7} 30
- **Figure15 :** Incubation des colonies sur un milieu anaérobiose 32
- **Figure16 :** Purification des isolats 33
- **Figure17 :** Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées 34
- **Figure18 :** Résultats du taux de matière grasse du beurre fermier 37
- **Figure19 :** Résultats du MG du beurre fermier de vache et brebis 38
- **Figure20 :** Résultats de l'EST de beurre fermier de vache et de brebis 39
- **Figure21 :** Résultats du dénombrement du beurre de vache sur milieu Elliker 41
- **Figure22 :** Résultats du dénombrement de beurre de brebis sur milieu MRS 41

Listedesfigures

- **Figure23** : Résultats d'isolement des bactéries lactiques de beurre fermier (Vache et brebis). 42
- **Figure24** : Résultats de la 1^{ère} purification des isolats lactiques 42
- **Figure25** : Résultats de la 2^{ème} purification des isolats lactiques du beurre fermier 43
- **Figure26** : Résultats de la 3^{ème} purification des isolats lactiques 43
- **Figure27** : Résultats de l'absence de *leuconostoc* 44
- **Figure28** : Aspect macroscopique des isolats 44
- **Figure29** : Aspect microscopique des isolats 45
- **Figure30** : Résultats de l'enrichissement des isolats 46
- **Figure31** : Résultats de la conservation 48
- **Figure32** : Evolution du Ph et de l'acidité des isolats lactiques à différents temps 49
- **Figure33** : Résultats de l'activité protéolytiques des isolats isolés du beurre traditionnel de brebis 49

Liste des annexes

Annexe01 : Produits et matériels utilisés

Annexe02 : Milieux de culture

Annexe03 : Coloration de Gram

Annexe 04 : Résultats du dénombrement

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction	01
---------------------------	-----------

Premier partie : Synthèse bibliographique

Chapitre01 : La technologie du beurre fermier

1. Définition du beurre fermier	04
2. Composition du beurre fermier	04
3. Structure du beurre fermier	05
4. Fabrication traditionnelle du beurre fermier	07
4.1 Méthode traditionnelle	07
4.1.1 Écrémage spontané.....	07
4.1.2 Barattage.....	08
4.1.3 Lavage.....	09
4.1.4 Malaxage.....	09
4.1.5 Salage.....	09
5. Procédé de fabrication d'un beurre fermier.....	10
5.1 La conservation du beurre traditionnel.....	10
6. La microbiologie du beurre traditionnel	10
6.1 La flore d'altération.....	11
6.2 La flore indigène	11

Chapitre02 : Les bactéries lactiques

1. Définition des bactéries lactiques	13
2. Habitat.....	13
3. Principaux caractéristiques des bactéries lactiques.....	13
4. Principaux genre des bactéries lactiques.....	13
4.1 Le genre <i>Lactobacillus</i>	13
4.2 Le genre <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus</i>	14
4.3 Le genre <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	14
4.4 Le genre <i>Enterococcus</i>	15
4.5 Le genre <i>Bifidobacterium</i>	15
4.6 Le genre <i>Pediococcus</i>	15
5. Classification des bactéries lactiques	16
5.1 Classification classique.....	16

5.2 Classification moderne.....	16
6. Les méthodes taxonomiques.....	17
6.1 Les méthodes phénotypiques	17
6.1.1 Caractère morphologique.....	18
7. Métabolisme des bactéries lactiques.....	18
7.1 Principale voie fermentaire.....	18
7.1.1 Voie homofermentaire.....	18
7.1.2 Voie hétérofermentaire.....	18
8. Propriétés fonctionnelles et technologiques des bactéries lactiques.....	19
8.1 Activité protéolytique.....	19
8.2 Pouvoir acidifiant	20
8.3 Activité aromatisante.....	20
9. Intérêt des bactéries lactiques.....	20

DEUXIEME PARTIE: PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 01: Matériels et méthodes

1. Objectif de l'étude.....	25
2. lieu et durée du travail.....	25
3. Origine des échantillons	26
4.1 Méthode.....	26
4.1.1 Protocole expérimentale.....	27
5. Technique d'analyse.....	27
5.1 Analyse physico-chimique.....	27
5.1.1 Mesure du taux butyreux	27
5.1.2 Détermination de l'extrait sec total	28
5.2 Techniques de préparation de prises d'essais pour les analyses microbiologique.....	29
5.2.1 Règles générales de la bonne pratique du laboratoire.....	29
5.2.2 Préparation de la solution mère.....	29
5.2.3 Préparation des dilutions décimales.....	30
5.2.4 Recherche et dénombrement de la flore lactique du beurre fermier.....	31
5.2.5 Dénombrement de la flore lactique sur milieux gélosés.....	31
5.2.6 Isolement des bactéries lactiques.....	32
5.2.7. Purification des bactéries lactiques.....	32
6. Recherche de <i>leuconostoc</i>	33
7. Conservation des souches.....	33

7.1	Conservation à court terme.....	33
7.2	Conservation de longue durée.....	33
8.	Tests de vérification pour l'identification des bactéries.....	34
8.1	Vérification des bactéries lactiques isolées.....	34
8.1.1	Test de production de catalase.....	34
8.1.2	Observation macroscopique.....	34
8.1.3	Observation microscopique.....	34
9.	Identification des isolats lactiques.....	35
10.	Etude de quelques aptitudes technologiques des isolats.....	35
10.1	Pouvoir acidifiant.....	35
10.2	Activité protéolytique.....	35

CHAPITRE 02: Résultats et discussion

1.	Résultats des analyses.....	37
1.1	Résultats des analyses physicochimiques.....	37
1.1.1	Résultats de la matière grasse.....	38
1.1.2	Résultats du pH.....	39
1.1.3	Résultats de l'extrait sec total.....	40
2.	Résultats des analyses microbiologiques.....	41
2.1	Recherche et dénombrement des flores lactiques.....	41
2.2	Résultats d'isolement des bactéries lactiques.....	42
2.3	Purification des souches lactiques.....	42
2.3.1	La 1 ^{ère} purification.....	42
2.3.2	La 2 ^{ème} purification.....	43
2.3.3	La 3 ^{ème} purification.....	43
3.	Résultats de la recherche des <i>leuconostoc</i>	44
4.	Résultats de conservation des souches.....	44
5.	Résultats de vérification des isolats lactiques.....	45
5.1	Critères macroscopiques.....	45
5.2	Critère microscopiques.....	46
6.	Résultats de conservation des isolats.....	95

7. Résultats de l'identification	96
8. Résultats de quelques aptitudes technologiques	97
8.1 Pouvoir acidifiant	98
8.2 Activité protéolytiques	99
Conclusion.....	52
Références bibliographiques.....	55
Annexe	

Résumé

Notre étude est basée sur la caractérisation de la microflore lactique du beurre fermier. Nos échantillons de beurre fermier de vache et de brebis proviennent de différentes régions de la wilaya de Naâma. Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire LTSPA. L'objectif de notre étude est d'évaluer les qualités physico-chimiques et les caractéristiques microbiologiques de nos échantillons.

L'analyse physico-chimique consiste à la mesure taux de matière grasse, de l'extrait sec total puis le pH

L'étude microbiologique de nos échantillons de beurre fermier de brebis et de vache sur différents milieux de culture (MRS, M17, Elliker) consiste au dénombrement, à l'isolement puis purification des bactéries lactiques. Les aptitudes technologiques telles que l'acidité et l'activité protéolytique ont été testés. L'identification de 3 isolats par les méthodes morphologiques a révélé une dominance du genre *Lactobacillus*

Les mots clés: Beurre fermier, bactéries lactiques, identification, aptitudes technologiques

Abstract

Our study is based on the characterization of the lactic microflora of free-range butter. Our samples of free-range cow and sheep butter come from different regions of the wilaya of Naâma. This work was carried out at the LTSPA laboratory. The objective of our study is to evaluate the physico-chemical qualities and the microbiological characteristics of our samples.

The physico-chemical analysis consists of measuring the fat content, the total dry extract then the pH. The microbiological study of our samples of free-range sheep and cow butter on different culture media (MRS, M17, Elliker) consists of counting, isolating and then purifying lactic acid bacteria. Technological aptitudes such as acidity and proteolytic activity were tested. The identification of 3 isolates by morphological methods revealed a dominance of the genus *Lactobacillus*.

Keywords: Farmbutter, Lactic acid bacteria, Identification, Technological skills

ملخص

تعتمد دراستنا على توصيف البكتيريا اللبنية للزبدة ذات النطاق الحر. وتأتي عيناتنا من زبدة الأبقار والأغنام من مناطق الهدف من دراستنا هو تقييم الصفات الفيزيائية LTSPA مختلفة من ولاية النعامة. تم تنفيذ هذا العمل في مختبر والكيميائية والخصائص الميكروبيولوجية لعيناتنا

يتكون التحليل الفيزيائي الكيميائي من قياس محتوى الدهون ، والمستخلص الجاف الكلي ، ثم الرقم الهيدروجيني تتكون الدراسة الميكروبيولوجية لعيناتنا من زبدة الأغنام والبقر الخالية من المراعي على أوساط استنبات مختلفة (MRS ، M17 ، Elliker) من عد بكتيريا حمض اللاكتيك وعزلها ثم تنقيتها. تم اختبار القدرات التكنولوجية مثل الحموضة ونشاط التحلل. كشف التعرف على 3 عزلات بالطرق المورفولوجية عن هيمنة جنس *Lactobacillus*

لكلمات المفتاحية: زبدة المزرعة ، بكتيريا حمض اللاكتيك ، التعريف ، المهارات التكنولوجية

Introduction

Une grande variété de produits laitiers est préparée traditionnellement en Algérie dont le but est la préservation du lait pour utilisation ultérieure. Les produits laitiers traditionnels algériens les plus importants qui ont la signification commerciale sont : Raïbe, L'ben, K'lila, Zebda et j'ben **(BENKERROU *Metal*, 2004)**.

En Algérie, le lait cru est transformé par des méthodes traditionnelles en (Lben), en (Zebda) ou en (Dhan) et autres produits laitiers. Ces produits gardent leurs qualités désirables même après une longue conservation à température ambiante. Zebda est un produit laitier algérien, fabriqué à partir du lait cru entier par des méthodes traditionnelles. La fermentation du lait cru aboutit à la formation d'un lait caillé qui est baratté jusqu'à la séparation des grains du Zebda. Il est conditionné par la suite dans des spots en plastiques fermés hermétiquement et entreposés à une basse température. Ce produit cru n'ayant pas subi au préalable un traitement thermique.

Il est bien connu que les bactéries lactiques occupent une place importante dans les technologies laitières et elles constituent un vaste groupe bactérien dont la taxonomie est régulièrement remise à jour avec la progression des données moléculaires. Elles regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. **(Djerdiretal, 2018)**

Les bactéries lactiques sont des microorganismes présentant des caractéristiques morphologiques, physiologiques, et métaboliques variées. **(Hammache *et al*, 2018)** Une large gamme d'activités métaboliques et propriétés sont recherchées chez ces bactéries pour un usage industriel, telle que l'acidification, la protéolyse, etc. **(Aibeche, 2019)**

Le secteur industriel s'intéresse beaucoup aux bactéries lactiques. Ils sont largement utilisés dans les processus de fermentation lactique qui aboutissent à la création de produits alimentaires. Ils garantissent une bonne sécurité alimentaire ainsi que certaines qualités d'arôme et de texture. La création d'acide lactique, tels que les acides lactique et acétique, qui réduisent le pH de milieu **(Alaouiet *al.*, 2016)**

L'objectif de notre travail consiste à réaliser :

- Des analyses physicochimiques
- Une identification microbiologique
- Et enfin quelques aptitudes technologiques pour déterminer la qualité du Zebda traditionnel de vache et de brebis de la région de Naâma.

Le mémoire est structuré en trois principales parties, en plus de l'introduction, de la conclusion générale et quelques perspectives.

- La première partie est une revue bibliographique mettant l'accent sur la technologie du beurre fermier, et les bactéries lactiques
- La seconde partie consacrée au matériel et méthode présente la démarche adoptée. Elle traite les analyses physicochimiques et microbiologiques, les techniques d'identification des isolats, l'évaluation de quelques aptitudes technologiques.
- La troisième partie est consacrée aux résultats et à leur discussion. Enfin le mémoire s'achève par une conclusion et quelques perspectives.

CHAPITRE 1
LA TECHNOLOGIE DU BEURRE
Fermier

1. Définition du beurre fermier

Selon le Codex Alimentarius, Zebda (beurre traditionnel) est un produit gras dérivé exclusivement du lait et/ou de produits obtenus à partir du lait, principalement sous forme d'une émulsion du type eau dans huile. Il est obtenu par barattage de la crème du lait (**Benkerroum, 2013**). Zebda peut être préparé à partir du lait de différentes espèces ; le lait cru est soumis à une acidification spontanée à température ambiante jusqu'à la coagulation (**Idouiet al., 2010**).

2. Composition du beurre fermier

Le beurre fermier contient 2,7 g de protéines pour 100 g et pratiquement exclusivement de la matière grasse laitière pas moins de 80% de MG. Les lipides sont constitués de glycérides à 65 % saturés, 35 % insaturés, 15 % d'acides gras à chaîne courte et moyenne particulièrement digestibles et 3 à 5 % d'acides gras polyinsaturés importants (acide linoléique et linoléique).

Zebda est la seule matière grasse qui offre des quantités substantielles de vitamine A (une portion quotidienne de 24g correspond à environ 30% des besoins en vitamine A). Il est préparé à partir de crème (baratte), et chaque 100g contient 0,8g de protéines (**Vilain, 2010**).

En raison de son point de fusion bas, il est plus digeste et absorbe les nutriments plus rapidement que les autres graisses animales.

De petites quantités de protéines, de sucre de lait et d'eau dans Zebda en font un substrat approprié pour les microbes (**Ghasemloyetal., 2017**). (Tableau01)

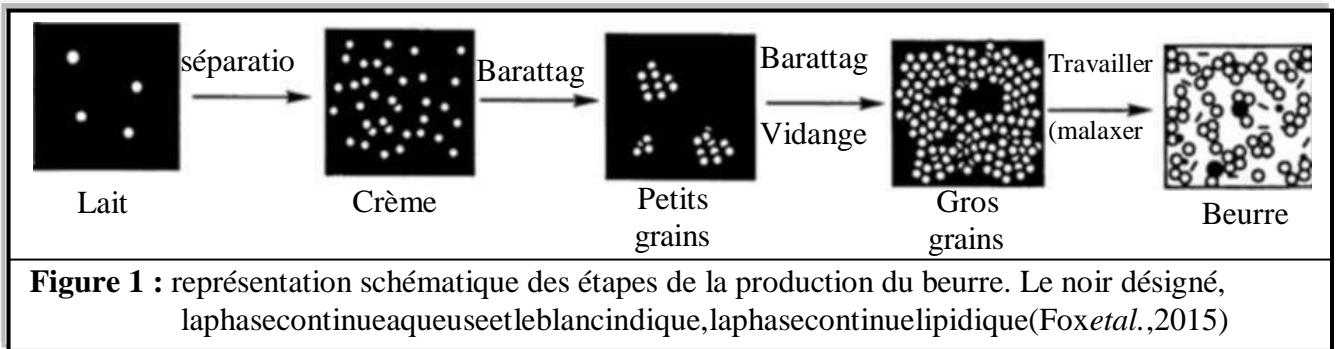
Tableau 01 : Composition moyenne pour 100 g de beurre (Apfelbaum, Romon, Dubus,2009)

Composants	Valeurs
Energie	3155Kjoules,755Calories
Lipides	83 g dont
Acidegra ssaturées	52,6g
Acidemono-insaturées	23,5g
Acide mono polyinsaturé	2g
Protéine	1g
Glucide	1g
Eau	15g
Cholestérol	250mg
VitamineA	900µgà1mg
Vitamine D2	5µg

3. Structure du beurre fermier

L'inversion de phase, ou transformation d'une émulsion de globules gras dispersés dans une phase aqueuse (lait écrémé) en une émulsion de gouttelettes d'eau dans une phase continue, est nécessaire à la fabrication du beurre(figure 1).(Romainetal,2008)

Le beurre est principalement constitué de matières grasses du lait, que l'on peut retrouver dans le beurres ou deux formes différentes :globulaire et libre. Ces deux types de matières grasses contiennent certaines à l'état liquide et d'autres à l'état cristallisé. Par conséquent, le rapport et la composition de ces deux types de matières grasses déterminent la fermeté et la consistance du beurre(Foxetal.,2015)



Les propriétés physicochimiques de la matière grasse du lait fluctuent tout au long de l'année en fonction de la race, du stade de lactation et de l'alimentation. De ce fait, la proportion d'acides gras insaturés est plus élevée et plus douce en été qu'en hiver. Les agglutinines peuvent se lier l'accouche externe des globules gras individuels et favoriser leur juxtaposition en groupes de plusieurs centaines d'unités, ce qui contribue à augmenter spécifiquement la graisse. De plus, certains globules forment diverses formes d'agglomérations de globules gras du fait de la présence d'une membrane plus ou moins envahissante, ce qui confère au globule gras un rôle prédominant dans la production de beurre. (figure01) (Lapointe-Vignola, 2002)

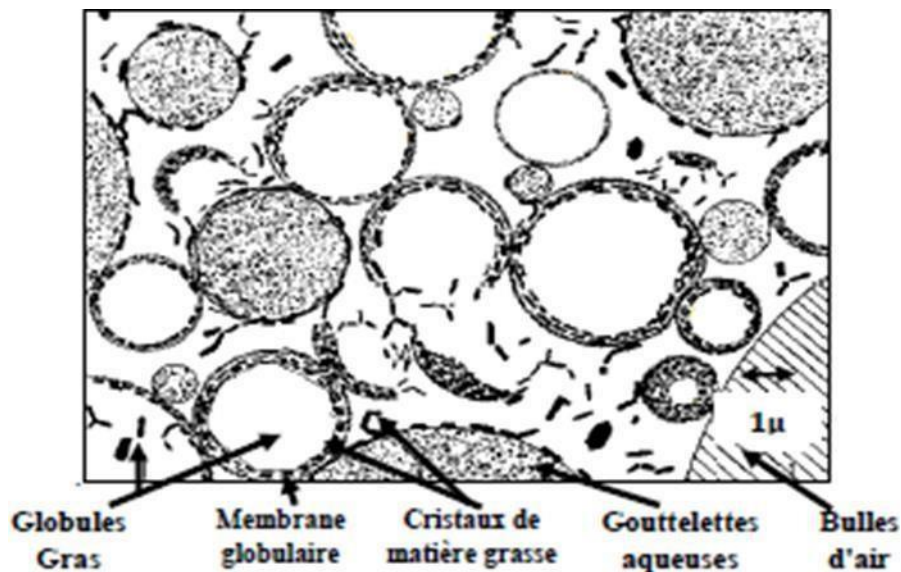


Figure02: Microstructure du Zebda à température ambiante (Walstra *et al.*, 2005)

4. Fabrication traditionnel du beurre fermier

4.2 Méthode traditionnel

il est reconnu depuis l'antiquité que les femmes des nomades jouaient un rôle très important dans la transformation du lait en sous-produits traditionnels, notamment le beurre frais est obtenu après barattage de Rayeb. Le barattage est effectué par le chekoua. Selon (**Lemouch ,2007**), la préparation du Chekoua consiste à utiliser la peau de différentes races (ovine ou caprine). La peau de chèvre ou de chevreau semble mieux drainer, elle est plus épaisse, plus solide et plus résistante aux chocs. Le Chekoua se présente comme un sac souple et humide, ayant la couleur de la peau et se caractérise par une certaine perméabilité. En effet, il joue à la fois le rôle de réservoir et de séparateur de phases (**Aissaoui et al.,2006**).

il est plus épais, plus solide et plus résistant aux chocs. Le Chekoua se présente comme un sac souple et humide, ayant la couleur de la peau et se caractérise par une certaine perméabilité. En effet, il joue à la fois le rôle de réservoir et de séparateur de phases. On le laisse se putréfier à température ambiante pendant environ 2 à 7 jours pour faciliter l'arrachage des poils ou de la laine. Après lavage à l'eau, la peau est traitée principalement avec du sel et du génévrier pendant 10 jours, puis la peau interne est laissée attachée à la baignoire (2litres/nuit)(**Clapset al.,2011**).

4.2.1 Écrémage spontanée

Le lait étant maintenu au repos, la séparation des globules Grass 'effectue en régime laminaire, c-à-d sans turbulence. La loi de stokes permet d'exprimer la vitesse d'ascension des globules à la surface du lait (**Veisseyre,1999**). En fait le phénomène est modifié par la présence des agglutinines, à la surface des globules. Elles tendent à favoriser le rapprochement de ceux-ci et la formation de grosses grappes de globules dont la force ascensionnelle est beaucoup plus élevée que celle qui résulte de l'application de la formule de stokes au globule isolés. C'est ce phénomène d'agglomération naturelle qui permet d'effectuer en un écrémage spontané Satisfaisant (**Veisseyre, 1999**). La température à laquelle se fait l'écrémage joue un très grand rôle dans le résultat, il se fait à température ambiante et dure 24 à 48h selon la saison .La forme de vase dans lequel se fait l'écrémage est indifférente. Il faut de préférence, pour faciliter du nettoyage de choisir des vases larges facilement accessible dans toute leurs parties, les vases de verre, de porcelaine, des outres en peau ou des seaux en bois sont aussi réservés à cet usage, les quels apportent vrai semblablement acidifiante nécessaire (**Chirade et Moreau,2000**),

4.2.2 Barattage

Le barattage traditionnel, c'est une agitation énergétique de la crème favorisant l'incorporation de bulle d'air dont l'interface est dans un premier temps stabilisée par les GG (mousse abondante). Lorsque les GG deviennent insuffisants pour recouvrir l'interface gazeuse générée, la mousse va effondre. Les membranes des GG fragilisées pendant la maturation physique de la crème, éclatent alors à l'intérieur de la baratte. La libération de la MG liquide forme une phase continue qui soude les GG résiduels et les fragments de GG en grains de beurre (**Jeantet *et al*, 2006**). La fabrication de beurre d'après le procédé conventionnel (ou discontinue) est une application du principe de l'agglomération (**Vignola, 2002**). Cette technique de barattage traditionnel peut paraître quelque peu désuète comparativement aux performances actuelles des nouvelles générations de butyrates, par contre elle présente l'avantage de bien faire comprendre les performances d'inversion des phases grasses et aqueuses, contrairement au butyrateur ou le passage de la crème (émulsion de type huile dans l'eau) au beurre (émulsion de type eau dans l'huile) est instantané (**Luquet, 1990**).

Les facteurs qui vont favoriser ces phénomènes seront: la température de barattage, l'acidité de la crème, et la taille des globules gras (**Luquet, 1990**)



Figure03: Barattage traditionnel du beurre à l'aide d'une baratte classique(Samet-Bali *etal*,2000)

4.2.3 Lavage

Il permet de refroidir et de resserrer le grain, de diluer les gouttelettes de babeurre par de l'eau afin de limiter le développement microbien. En général, on ne peut pas descendre en dessous de 0,5 à 1% de non-gras (Jeantet *etal*, 2008).

4.2.4 Malaxage

Le but du mélange est de répartir uniformément l'air, l'eau, le sel et les composés aromatiques dans toute la masse butyrique, de poursuivre l'élimination de la graisse liquide et des cristaux des globules gras qui ont été endommagés par le barattage et de bien mélanger les grains de beurre pour produire un produit fini avec la consistance et la texture désirées.

De plus, il permet de pulvériser la phase aqueuse en fines gouttelettes de diamètre moyen inférieur à 5 µm à l'intérieur de la graisse et de souder les grains de beurre. Il permet la production d'environ 10¹⁰ gouttelettes non grasses par gramme de beurre lorsqu'il est fait correctement. Il conseille généralement de poursuivre le mélange jusqu'à ce que le beurre ait une consistance dure, une texture cireuse et un aspect brillant, ainsi que jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de gouttelettes d'eau visibles à l'intérieur du beurre (Angers, 2010).

4.2.5 Salage

Le sel contribue à rehausser la saveur et à prolonger la conservation du beurre. Ses propriétés antiseptiques permettent d'y restreindre la croissance microbienne et de prévenir certains défauts. Le sel incorporé au beurre doit être chimiquement pur, extra fin, rapidement et complètement soluble (Angers, 2010).

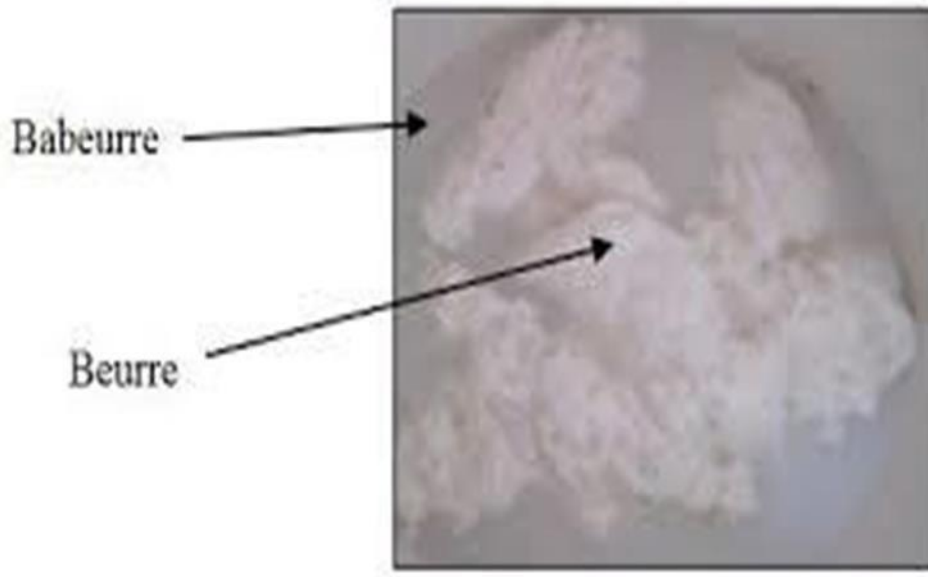


Figure04: Photo du beurre et de babeurre (Makhloufi,2012)

5. Procédé de fabrication d'un beurre fermier

5.1 La conservation du beurre traditionnel

Le beurre fermier est fabriqué avec de la crème crue et doit être utilisé dans les 10 jours suivant la fabrication au congélateur. Son stockage ne doit pas durer plus de 3 à 4 mois. Tous ces dangers d'altération ont obligé les agriculteurs à appliquer le procédé de conservation par salage afin de prolonger la durée de conservation de cette denrée périssable. Le beurre est altéré par la chaleur du soleil, et il prend rapidement la saveur des produits qui l'entourent (BoukhatemMeriem,2021).

6. La microbiologie du beurre traditionnel

Les bactéries lactiques sont responsables de l'acidité élevée, tandis que les bactéries lipolytiques décomposent et oxydent la teneur en graisse de Zebda, la faisant rancir, et les bactéries protéolytiques décomposent la caséine, lui donnant une saveur de fromage. La couleur et la saveur du Zebda sont causées par des *entérobactéries coliformes* et d'autres bactéries. La flore lactique naturelle ou la flore lactique introduite au levain constitue la flore principale de Zebda. *Lactococcus diacety lactis* constitue la flore naturelle. Immédiatement après *Lactococcus cremoris*. Ces deux espèces sont chargées de créer le parfum dans le Zebda (Bettachetal.,2012).

Les altérations du Zebda sont provoquées par les bactéries psychrophiles (*Pseudomonas* et bactéries apparentées) ou leurs lipases qui entraînent une acidité. Les odeurs putrides peuvent être provoquées par *Shewanella putrefaciens*, des colorations diverses sont provoquées par des moisissures: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus* et *Geotrichum*. les moisissures sont microorganismes

Respectables de la détérioration du Zebda, la majorité des espèces étant *Thamnidium*, *Cladosporium* et *Aspergillus* (BenkerroumetTamime,2004)

6.1 Flore d'altération

Cette flore n'entraînera des déficiences olfactives pour l'apparence, l'arôme et la taille des gouttelettes. Elle finira par raccourcir la durée de conservation du produit alimentaire. Trois groupes microbiologiques prédominent : les bactéries coliformes (*Escherichia coli* et *Hafniaalvei*), les *Pseudomonas* du groupe des psychotrophes fluorescents et les streptocoques ; lactocoque (Vignola, 2010)

6.2 Flore indigène du beurre

Toutes les bactéries présentes dans le lait au départ du pis sont considérées comme faisant partie de la flore originelle des produits laitiers, qui est essentiellement stérile et protégée par des protéines appelées lacténines qui ont une réaction limitée pendant une courte période. (Cuq,2010)

CHAPITR 2:
LESBACTERIESLACTIQUES

1. Définition des bactéries lactique

Les Bactéries Lactiques (LAB : Lactic Acid Bacteria) sont des nutriments organiques des cellules procaryotes qui forment un groupe hétérogène (Badis *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2015 ; Ismail *et al.*, 2016). Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et métaboliques de ces bactéries sont recherchées pour un large éventail d'activités et de propriétés métaboliques à usage industriel, telles que l'acidification, la protéolyse, la production de polysaccharides, ... (Aibeche, 2020). à leurs bienfaits pour la santé, tels que *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (Bouguerra, 2021)

2. Habitat

Ils sont fréquemment liés aux aliments crus d'origine végétale et animale qui peuvent subir une fermentation, tels que les produits laitiers, les viandes, les légumes et les céréales (Bouguerra, 2021). Ils se multiplient lorsque la levure est ajoutée au pain, au vin ou à la bière (Menad, 2018). Ils peuvent survivre seuls dans l'environnement ou avec des hôtes comme des personnes ou des animaux (Belyagoubi, 2014). Certains organismes se trouvent également dans les voies qui régulent les systèmes digestif, reproducteur et respiratoire des humains et des animaux (Bouguerra, 2021).

3. Principaux caractéristiques des bactéries lactiques

Certaines de ces bactéries mésophiles peuvent prospérer à des températures aussi basses que 5 °C ou aussi élevées que 40 °C, et elles peuvent survivre à des pH aussi basique 4 à 8 (exceptionnellement, des valeurs de pH aussi élevées que 3,2 à 9,6). Il n'y a pas de cycle de Krebs présent dans ces bactéries exigeantes. Leur développement nécessite des acides aminés, des bases azotées et des vitamines, mais pas des cytochromes, des porphyrines (composants de la chaîne respiratoire), de la catalase ou du nitrate réductase. (Dribine *et al.* 2018), Ces bactéries sont souvent des micro-organismes aéro-anaérobifacultatifs ou microaérophiles stationnaires, tolérants aux acides et asporulants (Brahimi, 2015). Ils peuvent être ronds (genre *streptococcus* et *lactococcus*), en forme de bâtonnet (genre *lactobacillus*) ou ovoïdes (genre *leuconostoc* sp) (Boullouf, 2017)

4. Principaux genre de bactéries lactique

4.1 Le genre *Lactobacillus*

Le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae* est *lactobacillus*, qui comprend diverses espèces utilisées comme polluants ou comme agents de fermentation lactique dans une grande variété d'industries. Ce sont des bacilles stationnaires, asporulés, longs, fins et parfois recourbés qui sont fréquemment regroupés en chaînes (Figure 05). Catalase négative, pousse mieux entre 30 et 40 degrés Celsius. Les besoins alimentaires en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides,

Glucides et minéraux dans les lactobacilles sont extrêmement compliqués. (Menad, 2018)

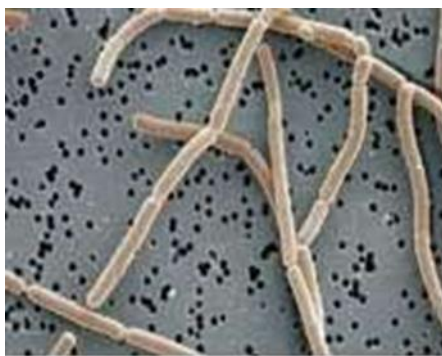


Figure 05 : *Lactobacillus bulgaricus* au microscope électronique. (Menad, 2018)

4.2 Le genre *Lactococcus* et *Streptococcus*

On pense que les streptocoques du groupe N du genre *Lactococcus* représentent les streptocoques dits "lactiques" car ils sont liés à plusieurs fermentations alimentaires et dépourvus de caractéristiques nocives. *Streptococcus* est encore un genre relativement vaste et sa catégorisation a subi plusieurs changements. La majorité des espèces de ce genre sont classées en deux groupes sur trois : pyogènes et hémolytiques. Les streptocoques que l'on trouve dans les aliments, comme les espèces de *Streptococcus thermophilus*, varient selon leur habitat (produits laitiers) et leur nature non pathogène. Orais (tels que *St. Salivarius* et *St. bovis*) et autres *streptocoques* rencontrés dans les aliments. Ces genres présentent tous les traits suivants : températures de croissance comprises entre 25 et 45°C, Anaérobies facultatifs, chimioorganotrophes, homofermentaire et catalase négative.

(Boudersa et al, 2017)

4.3 Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils recueillent les coquilles lenticulaires mésophiles, nettement hétérofermentaires, par paires ou chaînes, qui produisent de l'acide lactique.

Les coccobacilles hétérofermentaires appartenant au genre *Leuconostoc* produisent exclusivement de l'acide lactique et n'utilisent pas l'arginine pour produire de l'ammoniaque. Les *leuconostocs* sont mésophiles (optimum : 20-30°C ou PC) et sont caractérisés par la production, à partir du citrate du lait, de diacétyle, sont généralement utiles dans de nombreux types de fromages. Le *Ln. Mesenteroides* et *ssp. Cremoris*, en légumes fermentés (blé, olives, choucroute, lait.) interviennent également dans la filière lait (beurre et crème). (Negadi et al, 2017)

4.4 Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les *streptocoques* fécaux qui représentent une hémolyse de type α et β sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. Faecalis* et les espèces proches. Les *entérocoques* sont des coques qui peuvent être mobile, homofermentaire, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C. (Rakhisetal,2016)

4.5 Le genre *Bifidobacterium*

Les bactéries lactiques sont depuis longtemps associées au genre *Bifidobacterium*. Il a ensuite été classé comme appartenant au phylum Actinobacteria après avoir été isolé car sa concentration en G +C était supérieure à 50%. Leur pH de croissance idéal typique varie de 6,5 à 7 et leur température de croissance idéale est de 37 à 41 degrés Celsius. Ils ont une morphologie bifide en Y ou en V irrégulier. Ils décomposent les hexoses par hétérofermentation, générant ainsi de l'acide lactique et acétique. (Aibecheetal,2020)

4.6 Le genre *Pediococcus*

Les *Pedicoques* se présentent comme des coques à Gram positif sphériques ou lenticulaires, asporulés, immobiles, catalase le plus souvent négative, à fermentation hétérolactique, anaérobies facultatifs, exigeants du point de vue nutritionnel et le GC% varie de 34% à 44%. Ils sont généralement isolés du matériel végétal (*Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus inopinatus* et *Pediococcus lolii*), des boissons fermentées, de la viande et des produits laitiers. Ce genre se compose de 12 espèces, certaines se distinguent par leur capacité à se développer dans un milieu contenant des teneurs très élevées, jusqu'à 18% de NaCl, comme *Pediococcus halophilus*. (Benhamadaetal,2020)

Tableau02: Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Bougeura,2021)

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	Homo ou hétérofermentaire	Mésophile ou thermophile
<i>Lactococcus</i>	Coque	Homofermentaire	Mésophiles
<i>Streptococcus</i>	Coque	Homofermentaire	Mésophiles ou thermophile
<i>Leuconostoc</i>	Coque	Hétérofermentaire	Mésophiles
<i>Bifidobacterium</i>	Forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophiles

5. Classification des bactéries lactiques

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu d'accord unanime sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'Union internationale de sociétés microbiologiques. (Khodja, 2018).

Selon les aspects morphologiques, biochimiques et physiologiques qui peuvent être observés. Des indicateurs de catégorisation chimique ont également été utilisés, tels que la teneur en acides gras et la composition de la membrane cellulaire (Belyagoubi, 2014).

La classification traditionnelle et la catégorisation contemporaine sont les deux catégories.

5.1 Classification classique

Basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la configuration de l'acide lactique produit et la tolérance aux fortes concentrations en sel et aux acides ou bases. (Bouguerra, 2021) D'autres caractéristiques phénotypiques et biochimiques sont utilisées pour identifier les espèces des BL, il s'agit de : la gamme des carbohydrates fermentés, l'hydrolyse de l'arginine, la production d'acétone (test de Voges-Proskauer), la tolérance aux sels biliaires, le type d'hémolyse, la production de polysaccharides extracellulaires, les besoins en facteurs de croissance, la présence de certaines enzymes (par exemple, β -galactosidase et β glucuronidase), les caractéristiques de croissance dans le lait et le typage sérologique. (Bouguerra, 2021)

5.2 Classification moderne

En se basant sur l'hybridation ADN-ADN et le séquençage du gène de l'ARNr16S, la classification des bactéries lactiques a pu être affinée. Elle a permis de regrouper des espèces (Le regroupement des espèces proches de *Lactobacillus* pour la création du genre *Carnobacterium*) et d'en séparer d'autres (La séparation du genre *Streptococcus* en: *Streptococcus* *ensustricto*, *Lactococcus* et *Enterococcus*) en créant de nouveaux genres. (Mermouri, 2018)

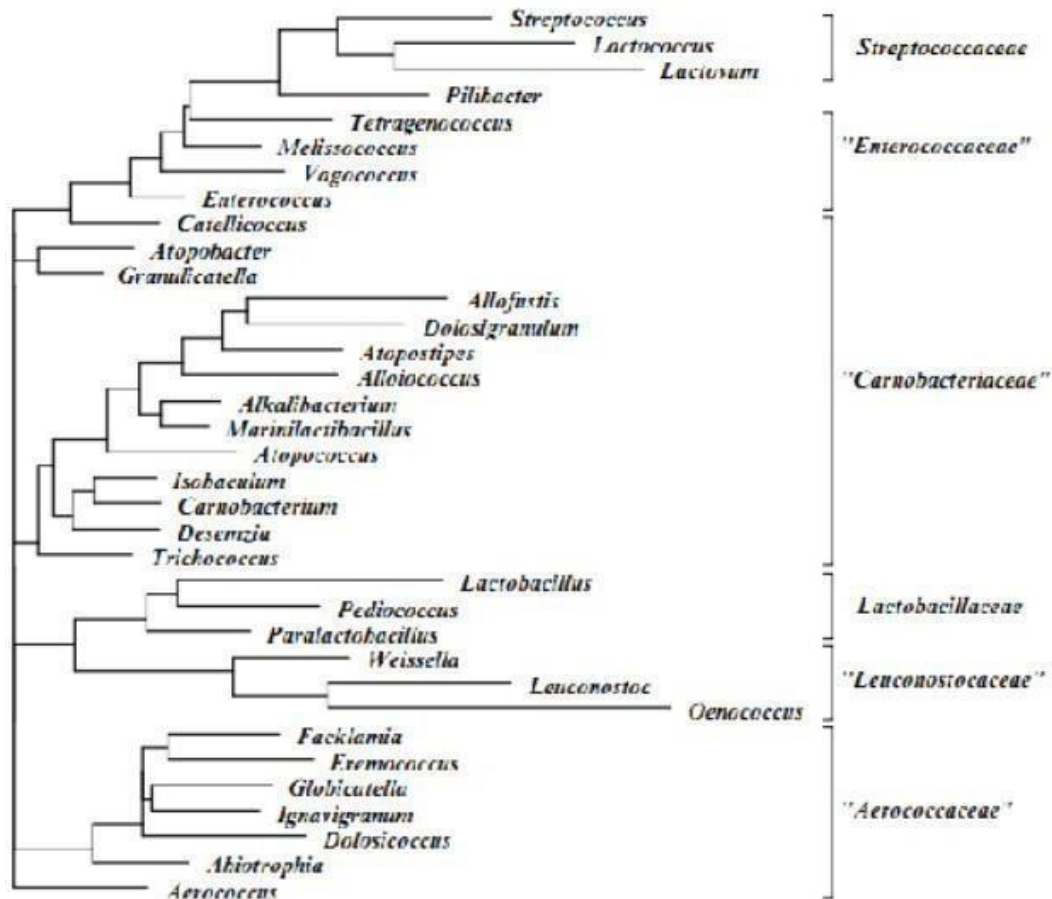


Figure06 : Arbre phylogénétique décrivant la relation entre les familles d'ordre *Lactobacillales* basé sur la séquence du gène 16S de l'ARNr (FELIS *et al.*, 2015)

6. Les méthodes taxonomiques

Plusieurs méthodes ont été appliquées pour l'identification des BL dans les produits alimentaires fermentés qui sont principalement regroupés en deux catégories : méthodes phénotypiques et moléculaires (génotypiques). Chaque méthode englobe différentes techniques, la méthode phénotypique, biochimiques, et chimio-taxonomiques et la méthode moléculaire englobe les techniques protéiniques, métaboliques et les technologies génomiques. (ElSheikha & Hu, 2020).

6.1 La méthode phénotypiques

Il y a des tests physiologiques et métaboliques/biochimiques, les tests phénotypiques sont les bases essentielles pour l'identification et la différenciation des bactéries lactiques et pour voir la morphologie des colonies bactériennes (POT, 2010).

6.1.1 Caractère morphologiques

L'étude morphologique consiste à décrire l'aspect des colonies, la couleur et la taille sur milieux solides. Elle est ensuite conduite par une coloration différentielle de Gram pour écarter les bactéries Gram négatif, à observer leurs formes coques ou bâtonnets et leurs modes de regroupement ainsi que la présence ou l'absence des spores.

7. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques tirent leur énergie de la phosphorylation au niveau du substrat. Il est possible de diviser les genres en deux grands groupes en utilisant le mécanisme de la fermentation du glucose, qui est un trait clé pour la séparation des genres. **(Belhamra, 2017)**

7.1.2 Voie homofermentaire

L'acide lactique est produit par des bactéries lactiques homofermentaires à partir de tout surplus de glucose. Selon les espèces, plusieurs méthodes sont utilisées pour transférer le glucose ou le lactose vers les cellules. Dans la dernière phase de la glycolyse, ils utilisent la voie EMP pour convertir le pyruvate en lactate, puis reconstituer le NAD⁺ à partir du NADH précédemment produit. Les bactéries utilisent une lactate déshydrogénase dans la dernière étape. **(Bekhouche, 2006)**

7.1.4 Voie hétérofermentaire

Ce groupe de BL utilise la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui consiste à phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation. Le pentose résultant est clivé en glycéraldéhyde phosphate qui suit la voie de la glycolyse une déshydrogénation du glucose, après sa donnant l'acide lactique et l'acétyl phosphate qui sera réduit en éthanol. En raison de la production de CO₂, d'éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique, cette fermentation est appelée hétérolactique **(Djellouli, 2018)**

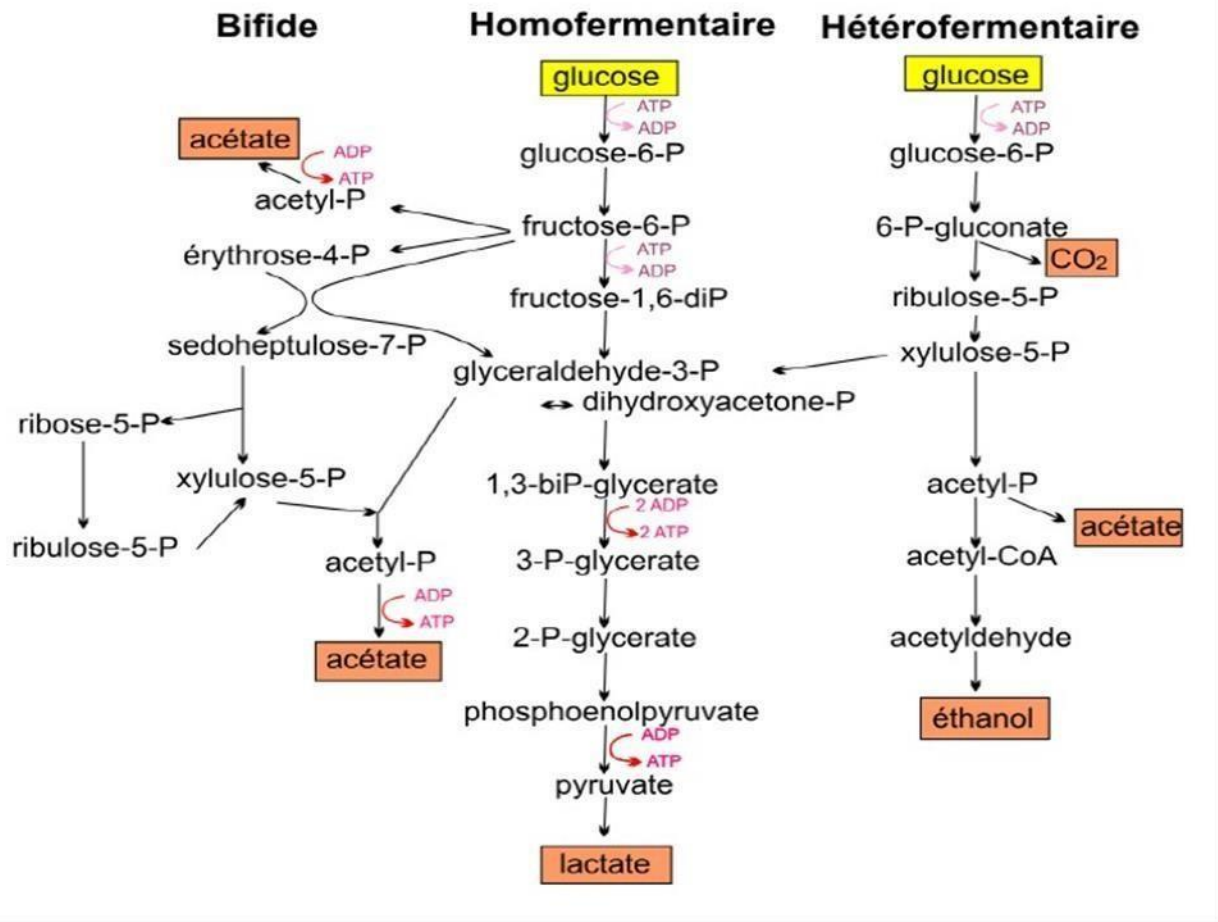


Figure08: Les deux principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (Bahri,2014).

7. Propriétés fonctionnelles et technologiques des bactéries lactiques

L'utilisation des LAB pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques

7.1 Activité protéolytique

Augmentation des densités cellulaires Un système protéolytique capable d'hydrolyser les protéines pour répondre à tous les besoins en acides aminés est nécessaire pour que les bactéries lactiques puissent exécuter les processus de fermentation. Du fait de leur machine enzymatique, les bactéries lactiques présentent une variété d'utilisations possibles pour la partie Azotée. Par rapport aux lactocoques, les lactobacilles présentent souvent une activité protéolytique importante (Hadeif,2012).

7.2 Pouvoir acidifiant

Pour la sélection des souches lactiques acidifiantes, la technologie laitière considère l'activité acidifiante comme un facteur particulièrement intéressant. L'acide lactique est produit lors de la fermentation BL des glucides et présente des avantages avantageux. Le taux d'acidification varie selon les espèces. Le pH est diminué par la fermentation des glucides, qui est nécessaire au caillage du lait, et l'acidité est augmentée, ce qui déclenche les réponses de changement souhaitées telles que l'évacuation du lactosérum. De plus, la création de jeux acides, la création de la texture, du parfum, du goût et de l'activité antibactérienne (**Boullouf,2017**).

7.3 Activité aromatisante

Les caractéristiques organoleptiques du produit dans lequel ils se développent sont intimement liées à leur action. En effet, certaines bactéries lactiques ont la capacité de produire des molécules parfumantes qui soutiennent les propriétés organoleptiques des fromages. La majorité des molécules gustatives, l'acétoïne et le diacétyl, sont produites par le métabolisme du citrate. Ces qualités aromatiques sont puissantes en brassage et avec de nombreux articles, elles ne sont donc pas toujours souhaitées (**Chemlal-Kheraz,2013**)

8. Intérêts des bactéries lactiques

Les denrées alimentaires sont mieux conservées grâce aux métabolites créés par les bactéries (**Caplice et Fitzgerald 2000**). Il est essentiel que les industries médicales et alimentaires travaillent ensemble pour produire des remèdes efficaces (**Carr et al., 2002**). Des études ont recommandé l'utilisation de bactéries lactiques spécifiques comme probiotiques en médecine préventive ; en les empêchant de décoloniser les parois du système digestif, ils permettraient la création d'une nouvelle flore intestinale susceptible de concurrencer une flore potentiellement dangereuse (**Fernandezetal.,1999;Daeschel1999,.Ammoretal.,2006**)

MATÉRIE ET MÉTHODES

1. Objectifs de l'étude

L'étude microbiologique réalisée répond à deux objectifs :

- Caractérisation et valorisation des souches lactiques
- Recherche et le dénombrement de la flore lactique du beurre traditionnel.
- Isolement et identification des bactéries lactiques.
- Aptitudes technologiques
 - Pouvoir acidifiant
 - Activité protéolytique

2. Lieu et durée du travail

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de recherche des Sciences et Techniques de Production Animales de Hassi-Mamèche, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

Période expérimentale: du mois de **Avril2023**au**Mai2023**.



Figure09: Situation géographique de laboratoire de recherche LSTPA de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem(GoogleMaps)

3. Origine des échantillons

Pour la réalisation de cette étude nous avons utilisé 02 échantillons provenant de la wilaya de Naâma la région de Elbiod et Mechria ; deux échantillon de beurre fermier type beldia de vache et de brebis prélevé aseptiquement et conservé dans une glacière à 04°C jusqu'au leur acheminement au laboratoire.

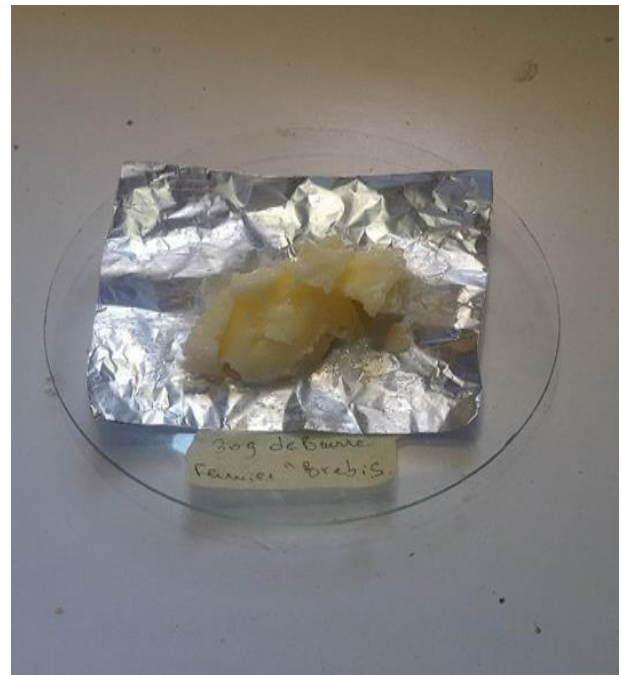
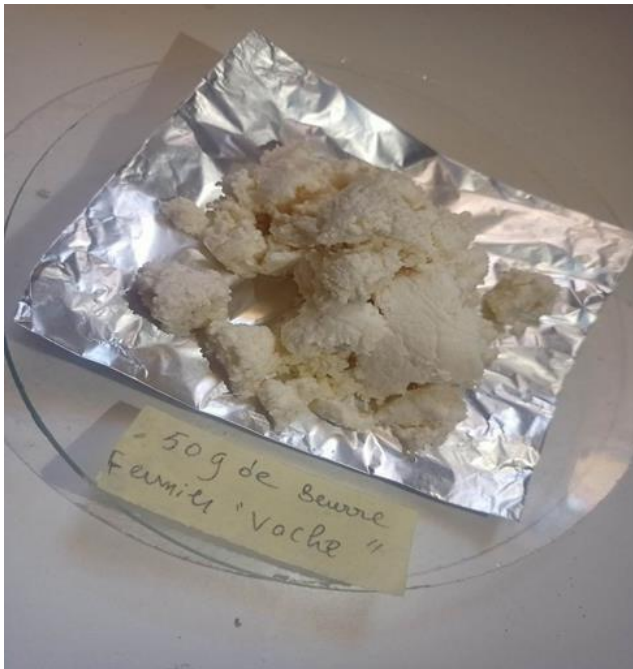


Figure 10: les échantillons de beurre fermier de vache et brebis

4. Méthodes

Cette analyse consiste à mettre en évidence la flore lactique contenue dans le beurre fermier. Nous nous sommes basés dans la détermination des genres, des espèces qu'on veut isoler sur les résultats de travaux réalisés par (Badiset al.;2012).

4.1. Protocole expérimentale

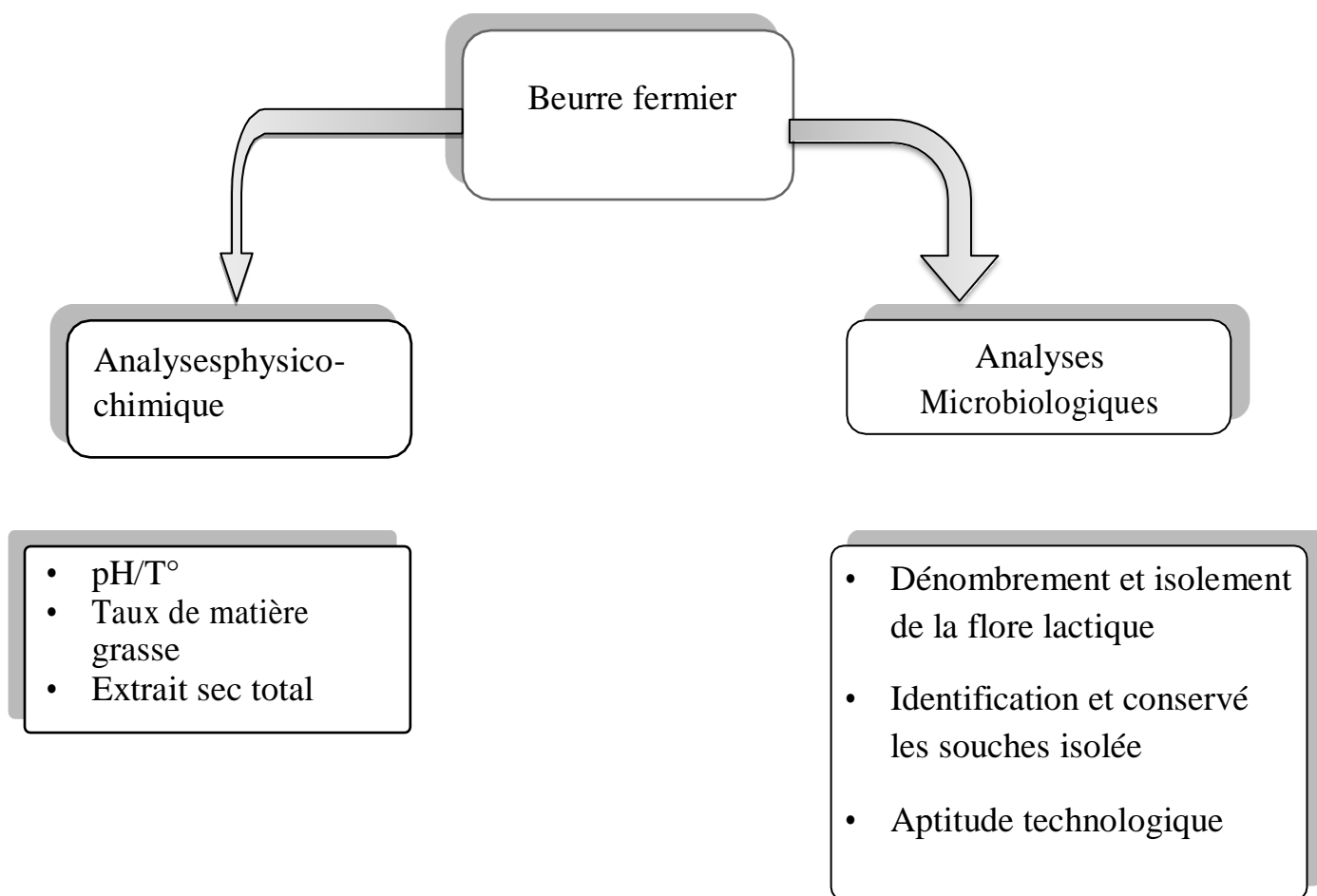


Figure 11: Protocole expérimental générale

5. Techniques d'analyse

5.1. Analyses physico-chimiques du beurre fermier

Pour assurer une bonne qualité du beurre fermier, le laboratoire effectue une gamme d'analyse physico-chimique

5.1.1 Mesure de taux butyreux

Cette analyse est réalisée au laboratoire de GIPAIT, L'acido-butyrométrie de GERBER est utilisée pour la détermination du taux de matière grasse. Dans un butyromètre, prendre 5g de beurre fermier ; ajouter 10ml d'acide sulfurique et 1ml d'alcool iso-amylique et 10ml d'eau pour faciliter la lecture, homogénéiser et placer le butyromètre dans la centrifugeuse (figure 03) pendant 5min afin d'obtenir la séparation de la MG puis faire la lecture (chaque centimètre dans l'échelle de butyromètre correspond à 10g de MG)



Figure 12: Détermination de la matière grasse du beurre fermier brebis et vache

5.1.2 Détermination du pH du beurre fermier

Installer les électrodes aux entrées correspondantes sur l'appareil, étalonner l'appareil à l'aide d'une solution tampon. Ensuite rincer l'électrode avec de l'eau distillée, puis plonger l'électrode dans l'échantillon à analyser et lire la valeur du pH directement (**Benaissa et al., 2016**).

5.1.3 Détermination de l'EST

L'extrait sec total (évaporation ou élimination de l'humidité du beurre fermier) est mesuré au moyen d'un dessiccateur (type précis HA 300), équipé d'un système de chauffage avec deux lampes à rayonnement infrarouge et d'un clavier permettant la programmation des paramètres d'analyse.

- On place une capsule en verre dans un dessiccateur réglé à 125°C et durant 25 minutes, pesé au moyen d'une balance analytique, Puis tarer (la masse de la capsule vide en gramme).
- A l'aide d'une spatule on prend 05g de beurre et on le disperse dans la capsule.
- On ferme la capsule et le résultat est obtenu après 25 minutes.

5.2 Techniques de préparation de prises d'essai pour les analyses microbiologiques

5.2.1 Règles générales de la bonne pratique du laboratoire

La manipulation de base est celle du transfert des germes d'un récipient à un autre, il faut donc respecter certaines règles lors des manipulations :

- Se laver les mains avant la manipulation ;
- Nettoyer et aseptiser les paillasse avant et après manipulation ;
- Travailler le plus près possible du bec bunsen avec ustensiles stériles ;
- Travailler de façon absolument aseptique ;
- Toutes les boîtes de pétri, bouillons ensemencés, ainsi que les ustensiles souillés (Pipettes, tube...) devront être autoclaves ou décontaminés.

Notre analyse microbiologique se base sur le dénombrement des germes recherchés dans le beurre fermier qui sont :

- Les bactéries lactiques d'un beurre fermier

5.2.2 Préparation de la solution mère

L'échantillon du beurre a été fragmenté à l'aide d'une spatule stérile et 10g ont été placés dans un sachet stomacher avec 90 ml d'eau péptoné on fait le mélange et le tout (figure 08) a été met dans un appareil stomacher il est a une T° ambiante (figure09).



Figure13:Préparation de la solution mère avec le stomacher

5.2.3 Préparation des dilutions décimales

Préparation des dilutions décimales mère du beurre Les dilutions décimales ont été réalisées à partir de la solution mère jusqu'à la dilution 10^{-7}

1 ml de la solution mère (phase aqueuse) a été prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml de la solution eau péptoné, ainsi s'obtient la dilution 10^{-1}

Après avoir homogénéisée soigneusement sur agitateur-vortex 1 ml de cette dernière a été prélevé et introduit dans un autre tube stérile contenant 9 ml d'eau péptoné pour obtenir la dilution 10^{-2} on fait la même manipulation jusqu'à 10^{-7} (Figure 14).

Les dilutions successives ont été effectuées de la même manière en partant toujours de la dilution précédente et en changeant à chaque fois l'embout pour ne pas perturber les dilutions, (Tessier, 2012)



Figure 14: Préparation des dilutions de beurre du 10^{-1} à 10^{-7}

5.2.4 Recherche et dénombrement de la flore lactique du beurre fermier

Les milieux de culture ainsi que les conditions d'incubation sont donnée par le tableau 01

Tableau03: Milieux de culture et conditions d'incubation pour la recherche et le dénombrement de la flore lactique du beurre traditionnel.

Germe recherchés	Milieux de culture utilisés	Les conditions d'incubation
Leuconostoc	Elliker	30°Cpd24H à 48H
Les lactobacilles	MRS	37°Cpd24H à 72H
Les coques	M17	37°C pd24H à 48h

5.2.5 Dénombrement de la flore lactique sur milieux gélosés

A partir des dilutions décimales, l'ensemencement des boites de pétri des lactobacilles, des lactocoques et des leuconostoc a été effectué en masse dans les milieux MRS dans un milieu anaérobie, puis M17 et Elliker respectivement. On étale 100 µl de chaque dilution sur les milieux de dénombrements, Les boîtes sont ensuite incubées 37°C pendant 24 h à 72 h.

Calcul standard après simple comptage

- Soit Σc la somme de toutes les colonies comptées sur toutes les boîtes retenues (et tel que au moins une des boîtes comptées contenait au moins 15 colonies).
- Soit V le volume inoculum appliqué à chaque boîte (en général exprimé en mL).
- Soit n_1 le nombre de boîtes retenues à la première dilution (en général 2).
- Soit n_2 le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution (en général 2).
- Soit d le taux de dilution de la première dilution retenue pour les comptages sur boîte.

$$[N] = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1 n_2) dV}$$

5.2.6 Isolement des bactéries lactiques

L'isolement des lactobacilles a été réalisé par étalement de 0,1 ml des dilutions 10^{-1} jusqu'à 10^{-7} à la surface de la gélose MRS (Man, Rogosa, Sharpe) substitué par la L cystéine additionnée par 10ml antifongique(fungizone) et celui des coques lactiques sur la gélose M17 puis les leuconostoc sur le milieu Elliker, L'incubation des boites Pétri a été faite à 37°C et celle de leuconostoc à 30°C pendant 48 à 72 heures, de chaque boite, une dizaine de colonies apparemment caractéristiques du groupe a été prélevée puis purifiée par repiquages successifs.



Figure15 : Incubation des colonies sur un milieu anaérobiose

5.2.7. Purification des bactéries lactiques

Afin de purifier les souches, des repiquages successifs sont effectuées sur les bouillons MRS et gélose (MRS et M17). La purification des souches consiste à les ensemercer en stries sur des boites de Pétri coulées avec des milieux MRS. Les boites sont ainsi incubées à 37°C pendant 48 h. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.



Figure16 : Purification des isolats

6. Recherche de *leuconostoc*

- Les isolats présumé *leuconostoc* on subit un enrichissement pour test de confirmation.

7. La conservation dessouches

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation des bactéries lactiques, et à 37 °C pendant 24h pour les bactéries lactiques, les tubes sont conservés à 4°C, la revivification de ces bactéries se fait toutes les trois (03) semaines.

7.1 Conservation à court terme

La conservation à court terme des isolats purifiés est effectuée par ensemencement dessouches pures sur gélose MRS inclinée à l'aide d'une anse en platine stérile. Après incubation à 30°C pendant 18h, Les tubes sont maintenus à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les trois à quatre semaines(Saidietal.,2002).

7.2 Conservation à long terme

A partir des jeunes cultures de 18 h sur milieu liquide. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation (beurre fermier70% et 30% de glycérol) sur le culot.Les cultures sont conservées en «Eppendorfs» à -20°C.Lafigure17 montre le

Protocole de conservation à longue durée (**Badiset al., 2004**). Les cultures peuvent être conservées plusieurs années.

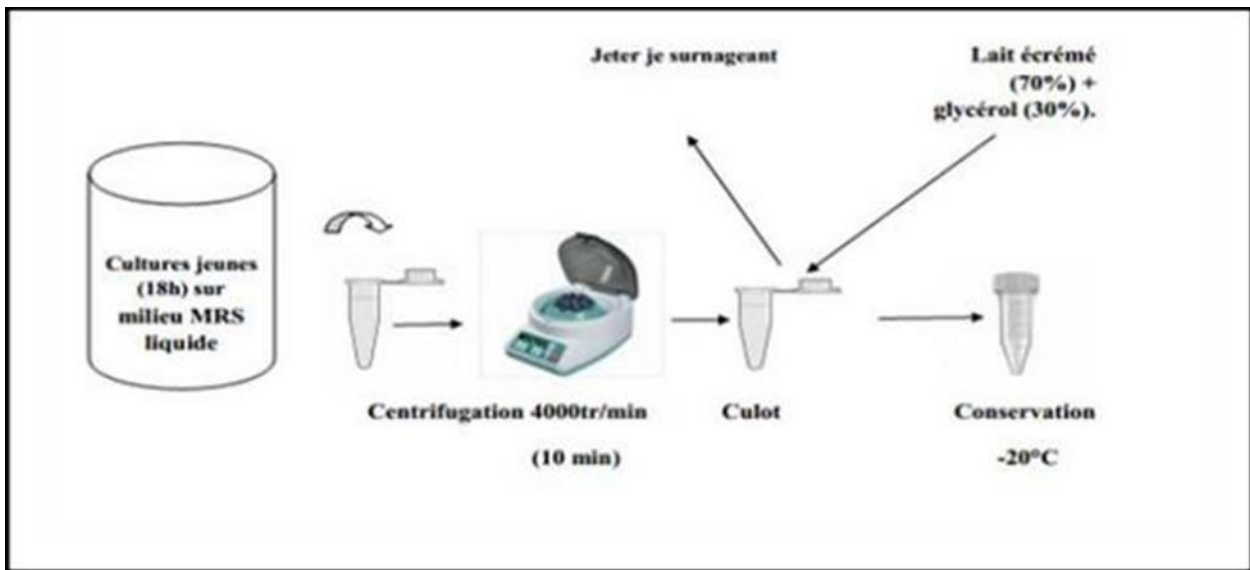


Figure 17: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées

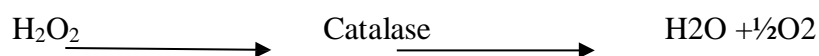
*

8. Tests de vérification pour l'identification des bactéries lactiques

8.1 Vérification des bactéries lactiques isolées

8.1.1 Test de production de catalase

Ce test a été réalisé selon le protocole expérimental décrit par (**Prescott et al., 2003**). Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu MRS gélosé à l'aide d'une anse stérile dans de l'eau oxygénée. Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a production de l'enzyme catalase et est positif. La réaction chimique de dégradation d'eau oxygénée établit comme suit



8.1.2 Observation macroscopique

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies, obtenus sur milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité).

8.1.3 Observation microscopique

L'observation microscopique au grossissement (GX100) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association.

9. Identification des isolats lactiques

Pour une identification préliminaire de ces bactéries, nous sommes basés sur une étude Morphologique ; les formes caractéristiques des colonies, leur coloration de Gram et test de catalase.

10. Etude de quelques aptitudes technologiques des isolats

10.1 Pouvoir acidifiant

L'un des critères technologiques les plus importantes chez les BL est leurs cinétiques de la production d'acide lactique ; la mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH en fonction du différents temps, d'autre part simultanément l'acidité totale par la soude.

La souche lactique isolées sontensemencées dans des flacons contient 200ml de laitcrémestérileestincubédans30°C,la lecture s'effectue à différentes périodes d'incubation 2h,4h, 6h,8het24h.

La mesure du pH et d'acidité s'appliquent de la manière suivante ; on prélève 10ml du flacon qu'on repartit dans un bécher puis mesurer le pH avec le pH mètre, ensuite mesurer l'acidité dans le bécher de 10 ml on ajoute 3 goutte de phénophtaléine on titre avec NaOH jusqu'au le virage de la couleur du blanc à la rose pale, dans le moment du changement on note le volume de NaOH écoulé, la couleur rose persistant10 sec au moins.

L'acidité est déterminée par la formule : Acidité (D°) = $\frac{V_{NaOH}}{V_{NaOH}} \times 100$ où VNaOH : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique.

10.1Activité protéolytique

Ce trait a un impact significatif sur les propriétés du produit final, notamment la texture et la saveur du beurre, produit en grande quantité dans l'industrie laitière. Le milieu Plate Count Agar (PCA) additionné de 10 % de lait écrémé est utilisé pour ce test. Un volume de 10 µl de culture fraîche est déposé dans des puits creusés préalablement dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont ensuite incubées à30°C pendant 24à 48heures (**Thapaetal.,2012**).

L'activité protéolytique est traduite par l'apparition de halos clairs autour des puits où ont été déposées les colonies bactériennes. Les halos les plus larges indiquent quels isolats ont une forte activité.

CONCLUSION

Conclusion

Le travail réalisé est basé sur la caractérisation des bactéries lactiques et l'évaluation de la qualité physico-chimique et microbiologique du beurre fermier fabriqué avec des méthodes traditionnelles, collectés au niveau des différentes régions de Naâma.

Cette étude nous a permis d'avoir une idée sur la composition de la flore lactique du beurre fermier de brebis et de vache. Les résultats des analyses physico-chimiques concernant la détermination du pH montre des moyennes 4,90 pour le beurre fermier de brebis et 6,80 la vache. En ce qui concerne la matière sèche, celle-ci varie entre 80% et 30,9. La valeur de la matière grasse elle oscille entre 83% et 70%.

Les valeurs des paramètres du beurre de brebis sont généralement comprises dans les intervalles proches aux normes retenues pour ce produit alors que les valeurs du beurre de vache ne le sont pas, selon les normes obtenues par le laboratoire GIPLAIT ont un intervalle de 80 à 84%

Concernant la qualité microbiologique, on a rapporté que les bactéries lactiques constituent la flore dominante du beurre ; d'après les résultats des analyses de nos échantillons, la différence entre la charge microbienne des BL indique probablement que la méthode de préparation du beurre qui se diffère d'une région à une autre pour influencer la flore

Aussi il y'a d'autres facteurs tels que le climat et la période de prélèvement qui ont fort effet sur le développement des BL (Lairini *et al*, 2014).

Ces résultats peuvent être compatibles avec une bonne qualité microbiologique et les conditions hygiéniques acceptables lors de la fabrication

A l'issue de ce qui a été réalisé trois souches de BL ont été isolées et purifiées à partir du beurre fermier après leur culture sur milieu spécifique, nous avons présumé que les souches isolées par les méthodes morphologiques les BL isolées et identifiées sont généralement des *Lactobacillus*

L'évaluation de quelque aptitude technologique a mis en évidence l'existence de bonnes fonctionnalités technologiques chez les isolats testés

Enfin, ces résultats peuvent être très intéressants du point de vue technologique.

- Aibeche, & Bellounes, (2020).** Etude du pouvoir protéolytique des bactéries lactiques, mémoire de master. Université Djilali Bounaama-Khemis Miliana, Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre Département de biologie, 44p.
- Aibeche, Bouit, & Ikhlef. (2019).** *Contribution à la modélisation magnétothermique des machines électriques synchrones à aimants permanents* (Doctoral dissertation, Université de Jijel).
- Alaoui, & Penta. (2016).** Endogenous depth of reasoning. *The Review of Economic Studies*, 83(4), 1297-1333
- ANGERS. 2010.** Beurre et fractions de matière grasse laitière. Dans : VIGNOLA C.L. *Science et Technologie du Lait*. Fondation de technologie laitière, Presses internationales polytechnique : Québec, p.323-347
- Apfelbaum. Romon. (2009).** Diététique et nutrition. Ed Masson (2^{ème} édition). 516p
- Badis., Saveanu., Fromont-Racine., & Jacquier. (2004).** Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Molecular cell*, 15(1), 5-15.
- Bahri, (2014).** Isolement et caractérisation de souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir des selles d'enfants, thèse de doctorat. Université Constantine I Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie, 147p.
- Bekhouche, (2006).** Bactéries lactiques du lait crû de vache et Microorganismes spectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase, thèse de doctorat. Université de Mentouri Constantine institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires, 149p.
- Belhamra, (2017).** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires, thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 147p
- Belyagoubi, (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens, thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, 209p.

Belyagoubi,, Abdelouahid, D.E. 2013. Isolation, identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria from traditional Algerian dairy products. *Advances in Food Sciences*. 35(1) :84-85

BENAISSA,,(2016). *Evolution des qualités physico-chimique, biochimique et microbiologique de la viande cameline au cours de son attendrissage et sa conservation selon différents modes* (Doctoral dissertation).

Benhamada, Boudjerida & Mati,, (2020). Identification phénotypique et moléculaire des bactéries lactiques, Mémoire de Master. -Jijel- Université Yahia Ben Seddik Mohammed, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 82p.

Benkerroum . (2013). Traditional fermented foods of North African Countries: Technology and Food Safety Challenges with Regard to Microbiological Risks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12:54.

Benkerroum, , Mekkaoui, , Bennani, & Hidane. (2004). Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1), 39-43.

Benkerroum,, Mekkaoui,, Bennani,, Hidane ,(2004). Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1):39-43.

Benkerroum,, Tammie.(2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology*, 21(4):399-413.

Bettache, Adjoudj,, Hadadji ., Kihal (2012). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. *World Applied Sciences Journal*, 17(4):480-488.

Bouchibane, 2023. Des bactéries lactiques isolées laitière artisanaux : aptitudes technologique et essais de fabrication d'un lait fermenté.

Boudersa, & Nekkaa,, (2017). Étude de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier fermenté: le yaourt brassé, Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 84p.

- Bouguerra, . (2021).** Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle, thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas, Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, 141p
- Boukhatem, 2021** Etude comparative entre un beurre fermier fabriqué à la laiterie de Mostaganem et un beurre artificiel du commerce (président)
- Boullouf, . (2017).** Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel Bouhezza, thèse de Magister. Université des frères Mentouri Constantine, institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.), 135p.
- Boullouf, . (2017).** Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel Bouhezza, thèse de Magister. Université des frères Mentouri Constantine, institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.), 135p.
- Brahimi, . (2015).** Isolement et Caractérisation Biotechnologiques des Bactéries Lactiques Isolées à Partir des Margines d'Olives «AMOREDJ » Fermentés, thèse de doctorat. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Faculté de science département de biologie, 203p.
- Burgain, ., Scher, ., Francius, ., Borges, ., Corgneau, ., Revol-Junelles, ., Cailliez Grimal, ., and Gaiani, . (2014).** Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 213, 21-35.
- Chemlal-Kheraz, . (2013).** Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique, thèse de doctorat. Université d'Oran faculté des sciences département de biologie, 217p.
- Chirade, ., Moreau, . (2000).** Fabrication pratique du beurre : Manuel publié par la Société Française d'encouragement à l'industrie laitière. Lisieux. pp. 1-4.
- Codex Alimentarius. (1999).** Norme générale pour l'utilisation de termes de laiterie CODEX STN 206-1999, p: 1-4.
- Cuq, . (2010).** Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du Languedoc. Université de Montpellier. pp: 20-25.
- Djedirr. (2018).** Proton exchange membrane fuel cell degradation and remaining useful life prediction based on artificial neural network. In *2018 7th International Conference on Renewable Energy Research and Applications (ICRERA)* (pp. 407-411). IEEE.

- Djellouli, (2018).** Production et caractérisation de peptides bioactifs issus de l'hydrolyse des protéines alimentaires par cas de protéines de coproduits marins les protéases des bactéries lactiques. Cas de protéines de coproduits marins, thèse de doctorat. Université Oran 1 Ahmed Ben Bella faculté des sciences de la nature et de la vie département de biotechnologie, 193p.
- Doan,., Van Hoorde, Cnockaert,., De Brandt, E., Aerts,., Le Thanh,., and Vandamme,.(2012).** Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Letters in Applied Microbiology*, 55(4), 265-273.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03287.x>
- Dribine,., & Khellal, (2018).** Evaluation de l'activité antibactérienne de quelques souches de bactéries lactiques. Thèse de doctorat. Université de Bouira, 75p.
- El Sheikha, , and Hu, (2020).** Molecular techniques reveal more secrets of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(1), 11-32. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1506906>.
- FELIS,., SALVETTI,., & TORRIANI,.(2015).** Systematics of Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, 2531. doi:10.1002/9781118868386.ch2.
- Fox, Uniacke-Lowe, McSweeney, & O'Mahony.(2015).** Milk Lipids. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 69-144.
- Gaglio,., Barbaccia,., Barbera,., Restivo,., Attanzio,., Maniaci,., Di Grigoli,., Francesca, N., Tesoriere,., Bonanno,., Moschetti,., and Settanni, (2021).** The Use of Winery by-Products to Enhance the Functional Aspects of the Fresh Ovine "Primosale" Cheese. *Foods*, 10(2), Art.2. <https://doi.org/10.3390/foods10020461>
- Ghasemloy Incheh,., Hassanzadazar,., Forouzan,., Banafshehchin E.I., Mozafarian,., Aminzade,., Hashemi. (2017).** A survey on the quality of traditional butters produced in West Azerbaijan province. *Iran International Food Research Journal*, 24(1):327-332.
- Hadef,.(2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales, thèse de magister. Université Kasdi Merbah-Ouargla Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers Département des Sciences de la Nature et de la Vie, 135p.

- Hammache, Cantalapedra-Navarrete, Castillo, & Palomares-Rius, (2018).** Prevalence, identification, and molecular variability of potato cyst nematodes in Algeria. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(6), 1293-1305.
- Holzappel, Haberer, Geisen, Björkroth, and Schillinger, (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl):365S–73S.
- Idoui, Benhamada, Leghouchi (2010).** Microbial quality, physicochemical characteristics and fatty acid composition of a traditional butter produced from cows' milk in East Algeria. *Grasas y Aceites*, 61(3):232-236.
- Jeantet, Croguennee, Schuck, Brulé, (2006).** Science des aliments. L. Stabilisation biologique et physico-chimique. Tee et Doc. Lavoisier, 351-376.
- Jeantet, Croguennee, Schuck, Brulé. (2008).** Science des aliments. L. Stabilisation biologique et physicochimique. Tee et Doc. Lavoisier, 8, 9, 65-83.
- Kaur, Lee, Park, and Sharma, (2017).** RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetables and food products from Korea. *LWT*, 77, 383-388. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.07>.
- Keogh. 2006.** Advanced Dairy Chemistry, Chemistry and technology of butter and milk fat spreads. 3eme Edition. Cork, Ireland: Springer Science, University College, Vol. 2p. 333-355.
- Khodja, (2018).** Caractérisation phénotypique et moléculaire de souches de bactéries lactiques productrices de bactériocine. Thèse de doctorat. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbès Faculté des sciences de la nature et de la vie département de biologie, 100p.
- Kimoto-**
- Nira, Kobayashi, Nomura, Sasaki, & Suzuki, (2009).** Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: analysis by using different growth media. *International journal of food microbiology*, 131(2-3), 183-188.
- Lapointe-**
- Vignola. (2002).** Science et technologie du lait: transformation du lait. Presses inter Polytechnique.
- LOUARDI, (2013).** Applications de la Spectrométrie de Masse, type MALDI TOF à la Bactériologie et à la Distinction de Variants Génétiques, Thèse de Doctorat, Ecole Doctorale, science de la vie et de la santé, Université de Strasbourg, p. 13, 14–51, 53.

- Luquet,.(1990).**Les produits laitiers: transformation et technologie. Tee. et Doc. Lavoisier, 454-490
- Marth, & Steele. (Eds.). (2001).** *Applied dairy microbiology*. CRC Press
- Mermouri,.(2018).** Étude de l'Effet de Souches Probiotiques de Bactéries Lactiques (Lactobacillus sp.), Isolées de Produits Fermentés, sur la Valeur Nutritive de Fourrages Conservés par Ensilage, thèse de doctorat. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed-Boudiaf, 177p.
- MIMOUN,.(2015).** Effet des Substances Antimicrobiennes Produites par *Leuconostoc mesenteroides* Isolées à Partir du Lait de Chamelle Algérien sur *Listeria* ssp. dans les Produits Alimentaires, Thèse de Doctorat, Spécialité, Microbiologie Appliquée, Université d'Oran, p.51-56.
- POT,.(2010).** the taxonomy of lactic acid bacteria; in book: «de la génétique aux ferments» éd., tec-doc., Lavoisier, paris, pp1-92.
- Rakhis, S., & Ladjal,.(2016).** Etude de quelques propriétés probiotiques de quelques souches *Lactobacillus* isolées de lait chamelle et de chèvre, mémoire de master. Université Abd ElHamid Ibn Badis Mostaganem, faculté de science de la nature et de vie, 74p.
- Romain, Thomas., Michel., Pierre. & Gérard B. (2008).** Les produits laitiers (2e ed.). Lavoisier.
- Rychert,.(2019).** Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *Journal of Infectiology and Epidemiology*, 2(4). <https://www.infectiologyjournal.com/articles/benefits-and-limitations-of-maldir-of-massspectrometry-for-the-identification-of-microorganisms.html>.
- Sabat,., Budimir,., Nashev,., Sá-Leão,., van Dijk,., Laurent,., Grundmann,., and Friedrich, W., on behalf of the ESCMID Study Group. (2013).** Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance*, 18(4). <https://doi.org/10.2807/e.18.04.20380-en>
- Saidi, Tahiri,., Brahim, & Saidi,.(2002).** Etats de contraintes et mécanismes d'ouverture et de fermeture des bassins permians du Maroc hercynien. L'exemple des bassins des Jebilet et des Rehamna. *Comptes Rendus Géoscience*, 334(3), 221-226.
- Samet-Bali,., Ayadi,., & Attia, . (2009).** Traditional Tunisian butter: Physicochemical and microbial characteristics and storage stability of the oil fraction. *LWT-*

Food Science and Technology, 42(4), 899-905.

Tessier.(2012). *Diagnostic de la contamination sédimentaire par les métaux/métalloïdes dans la rade de Toulon et mécanismes contrôlant leur mobilité* (Doctoral dissertation, Université de Toulon).

Veisseyre., (1999). Technologie du lait : Constitution, récolte, traitement et transformation du lait. 3^{ème} édition. Edition la maison rustique, Paris. p697.

Vignola., (2002). Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp.3-75

Vignola. (2010). Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp.3-75.

Vilain.(2010). Qu'est-ce que le lait?, Revue Française d'Allergologie, 50:124-127.

Walstra., Walstra., Wouters. & Geurts.(2005). Dairy science and technology. CRC press.

Annexe01

1.Produits et matériels utilisés

1. 1 Produits:02 échantillons de beurre fermier(vache et brebis)

1.1.1Matièrespremières

1.1.1. 1.Beurre

- Les échantillons sont prélevés de la région de NAAMA
- Ces prélèvements sont transportés dans une glacière
- Arrivés au laboratoire, ils sont mis au réfrigérateur en attendant les analyses.

1.1.2. Autres produits

- Eau distillée
- Eau péptonée

1.1.3 Milieux de culture

- MRS
- M17
- Elliker
- Les bouillons
- Gélose incliné
- PCA lait

1.1.2.1. Réactifs chimiques

- Tampons de pH(4,00 et 7,00)
- Hydroxyde de sodium NaOH(0,1Net3N)
- Acide acétique
- H₂O₂
- Violet de Gentiene
- Fushine
- Ethanol
- Lugol
- Alcool iso-amylique
- Huile à immersion
- Acide sulfurique
- Glycérole

- Eau oxygénée
- cystéine

1.2. Matériels

1.2.1. Verreries

- Ballon à fondplat
- Béchers(10ml-100ml-1000ml)
- Pipettes graduées(1ml-10ml-25ml)
- Pipettes pasteur
- Burette graduée(25ml)
- Capsules
- Tubes à essais
- Eprouvettes graduées(100ml, 250ml500ml)
- Verre à montre
- Lesflacons250ml
- Les boites pétries
- Les embouts bleus

1.2.2. Appareillages

- Centrifugeuse(HettichUNIVERSAL2s)
- Agitateur magnétique(STUART)
- Etuve(Memmert)
- PH-mètre(LEYBOLD-HERAEUS)
- Plaque chauffante(IKA-RCTbasic)
- Bainmarie(memmert)
- Réfrigérateur(kuhlbox2000)
- Balance électrique(KERN)
- Vortex(Kartell)
- Autoclave
- Microscope optique
- Dessiccateur(///ACIS).

1.2.3. Autres matériels

- Bec Bunsen
- Papier aluminium
- Pince

- Barreau magnétique
- Papier filtre
- Micropipette
- Spatule
- Lame

ANNEXE02

Milieux de culture

Les compositions sont données pour un litre d'eau distillée, le volume doit être amené à un litre d'eau à l'aide de la quantité nécessaire d'eau distillée. Le pH final, le temps et la température d'autoclavages ont mentionnés ainsi que les modalités particulières de préparation.

BouillonM17	
Bouillon de Terzaghi	
Peptone de soja	5,0g
Peptone de viande	2,5g
Peptone de caséine	2,5g
Extrait de viande	5,0g
Extrait de levure	2,5g
Lactose	5,0g
Acide ascorbique	0,50g
Glycéro phosphate de sodium	19,0g
Sulfate de magnésium	0,25g
Eau distillée qsp	1000mL
pH6,5	
Stérilisation: 120°C pendant 15 minutes	
Guiraud, 2003	

BouillonMRS	
Bouillon de Man Rogosa et Sharpe	
Peptone	10,0g
Extrait de viande	10,0g
Extrait de levure	5,0g
Glucose	20,0g
Tween80	1,0mL
Phosphate di potassique	2,0g
Acétate de sodium	5,0g
Citrate triammonique	2,0g
Sulfate de magnésium	200,0mg
Sulfate de manganèse	50,0mg
Eau distillée qsp	1000mL
pH6,2	
Stérilisation: 120°C pendant 15 minutes	
Guiraud, 2003	

GéloseMRS	
MilieudeManRogosaetSharpe	
Peptone	10,0g
Extrait de viande	10,0g
Extrait de levure	5,0g
Glucose	20,0g
Tween80	1,0mL
Phosphate di potassique	2,0g
Acétate de sodium	5,0g
Citrate triammonique	2,0g
Sulfate de magnésium	200,0mg
Sulfate de manganèse	50,0mg
Gélose	15,0g
Eau distillée qsp	1000mL
pH6,2	
Stérilisation:120°Cpendant15minutes	
Guiraud,2003	

Bouillon Elliker : (LEVEAU et al., 1991)	
Tryptone	20g
Extrait de levure	05g
Gélatine	2.5g
Lactose	05g
Saccharose	05g
Glucose	05g
Acetate de sodium	1.5g
Chlorure de sodium	04g
Acide ascorbique	0.5g
Eau distillée	1000 ml
Ph 6,8	
Sterilisation 121°C pendant 15min	

Annexe03

Coloration différentielle de Gram

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame propre.
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60secondes.
- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- Couvrir delugolpendant30secondes.
- Laverà l'eauidistilléependant5secondes.
- Rincer immédiatement le frottis avec l'alcool absolue par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette.
- Laverà l'eauidistilléependant5secondes.
- Couvrir avec de la fuschine pendant 15secondes.
- Laverà l'eauidistilléependant10secondes.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope.
- Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et de meurent bleues violettes, contrairement aux cellules Gram-qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe04

Tableau: Résultats de dénombrement de beurre de vache

	10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Mrs	210	120	110	100	57	54	50	37	3 2	14
M17	100	185	100	82	110	120	126	130	2 5	53
Elliker	200	180	140	190	32	25	5	3	0	0

Tableau: Résultats de dénombrement de beurre de brebis

	10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Mrs	117	118	90	53	24	20	17	6	3	4
M17	280	259	232	244	108	60	20	24	12	0
Elliker	192	204	32	48	32	28	0	0	0	0